



ИНСТРУКЦИЯ

применению реагентов для HLA-генотипирования для *in vitro* диагностики, в наборах и отдельных упаковках, семейства SECORE

Реагенты предназначены для секвенирования и для последующего разрешения неоднозначностей.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Реагенты предназначены только для исследовательских целей и не должны использоваться в рутинных диагностических процедурах. Прочитайте полностью эту инструкцию перед использованием.

НАЗНАЧЕНИЕ

Наборы семейства SeCore предназначены для непосредственного определения первичной последовательности ДНК в конкретном фрагменте HLA генома.

III. ПРИНЦИП МЕТОДА

Образцы ДНК подвергаются локус специфической ДНК амплификации в присутствии FastStart Taq- ДНК полимеразы. Продукты амплификации перед запуском на секвенирование обрабатываются ExoSap-IT, для удаления непрореагировавших праймеров и остатков свободных нуклеотидов. Нуклеотидная последовательность и финальный HLA генотип определяется многоцветным флуоресцентным красителем DYEnamic ET Terminator sequencing. Продукты реакции проходят очистку путем осаждения этанолом. Денатурированные формамидом образцы загружаются в секвенатор и результаты автоматически детектируются.

В наборах SeCore Sequencing Kits и GSSP используется универсальный краситель DYEnamic ET Terminator (Amersham). Принцип действия его основан на взаимодействии с цепями дидеоксинуклеотидных последовательностей и мечением их флуоресцентными красителями для последующей автоматической детекции. В этом случае каждый из четырех дидеокси окончаний ddG, ddA, ddT, ddC окрашивается двумя красителями: флуоресцентным и родаминовым. Флуоресцеин имеет широкий коэффициент экстинкции на длине волны 488нм в ионизированном аргоне лазере, который используется в секвенаторе. Флуоресцеин, выполняя роль донора флуорохрома забирает энергию лазерного излучения и передает ее акцептору- родамину, одной и той же молекулы. Каждый акцептор при этом дает эмиссию излучения той длины волны, которая присуща каждому конкретному дидеокси-основанию ДНК цепи.

В наборах SeCore Sequencing Kits и GSSP используется также термостабильная FastStart Taq- ДНК полимеразы (Amersham), которая поддерживает цикличность процесса денатурации элонгации и отжига с возрастающим уровнем сигнала матричной ДНК.

IV. СОСТАВ НАБОРА

Набор	Pre-PCR Components		Post-PCR Components			Хранение
Class I	Amp Mix (locus specific primers)	FastStart™ Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	ExoSap-IT™	Seq Mix (sequencing primers, dye terminators, Thermosequenase II DNA Polymerase)	Sequencing PPT Buffer	
A Locus	1 флакон	1 флакон	1 флакон	6 флаконов (Exon2-Fwd/Rev, Exon3-Fwd/Rev, Exon4-Fwd/Rev)	1 флакон	-20°C in a Non-Frost Free Freezer
B Locus Single Amplification	1 флакон	1 флакон	1 флакон	6 флакон (Exon2-Fwd/Rev, Exon3-Fwd/Rev, Exon4-Fwd/Rev)	1 флакон	-20°C in a Non-Frost Free Freezer

	комплект 1- 1 флакон комплект 2- 1 флакон	1 флакон	1 флакон	Exon2-Fwd/Rev Exon3-Fwd/Rev Exon4-Fwd/Rev	1 флакон	-20°C in a Non-Frost Free Freezer
as	1 флакон	1 флакон	1 флакон	6 флаконов (Exon2-Fwd/Rev, Exon3-Fwd/Rev, Exon4-Fwd/Rev)	1 флакон	-20°C in a Non-Frost Free Freezer

набор	Pre-PCR Components		Post-PCR Components			Хранение
Class II	Amp Mix (locus specific primers)	FastStart™ Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	ExoSap- IT™	Seq Mix (sequencing primers, dye terminators, Thermosequenase II DNA Polymerase)	Sequencing PPT Buffer	
DPB1 Locus	Exon 2 -1 флакон Exon 3 & 4 -1 флакон	1 флакон	1 флакон	8 флаконов (Exon2-Fwd/Rev, Exon3-Fwd/Rev, Exon4-Fwd/Rev) Codon 8,Codon85	1 флакон	-20°C in a Non-Frost Free Freezer
DQB1 2 Amp	Exon 2- 1 флакон Exon 3 -1 флакон	1 флакон	1 флакон	4 флакона (Exon2-Fwd/Rev, Exon3-Fwd/Rev,	1 флакон	-20°C in a Non-Frost Free Freezer
DRB1 Locus	1 флакон	1 флакон	1 флакон	3 флакона Exon2-Fwd/Rev TG Codon 86 rew	1 флакон	-20°C in a Non-Frost Free Freezer
DRB Group	11 флаконов	1 флакон	1 флакон	2 флакона (Group Exon2 1 флакон TG Codon 86 rew	1 флакон	-20°C in a Non-Frost Free Freezer
GSSP (используются совместно с набором DPB1 Locus)	-	-	-	1 флакон		-20°C in a Non-Frost Free Freezer

11 групп-специфичные AmpMix, включенные в SeCore DRB1 и DRB содержат специфичности:

DRB1*01, DRB1*03/11/13/14, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*08/12, DRB1*09, DRB1*10, DRB1*15/16, DRB3, DRB4, DRB5

V. ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ

96 луночный термоциклер, с нагреваемой крышкой

Амплификатор MJ Research PTC 225 DNA Engine Tetrad, Perkin Elmer Gene Amp 2700, 9600 and 9700

Автоматический ДНК Секвенатор: Applied Biosystems ABI Prism® 3100

ABI 3100 использует: 36-см 3100 капиллярный формат для ABI 3100, Applied Biosystems, кат номер 4315931.

MicroAmp® 96-луночный набор планшето/держателей, Applied Biosystems, кат номер 403081

MicroAmp® 0.2-ml реакционные пробирки, Реакционные пробирки (8 шт, в стрипе) и крышки (8caps/strip), Applied Biosystems кат номер N801-0533, N801-0580 and N801-0535

MicroAmp® Оптический 96-луночный реакционный планшет and 9600 крышка для планшета, Applied Biosystems кат номер N801-0560 and N801-0550

Настольная центрифуга с адаптером для 96-луночных планшет. Скорость 2500 x g

Дозаторы и наконечники: 1-10 μl, 10-200 μl, 100-1000 μl

Электронный диспенсер: для дозирования 1- 125 аликвот.

гокональный дозатор (8 или 12 каналов: с объемом дозирования 1-100 µl)
 ирование для гелевого электрофореза
 аждаемый планшет для пробирок 0.2 ml или лед, Diversified Biotech кат номер CSAF-
 Ю

агенты для секвенатора ABI 3100:

DP-6 polymer, Applied Biosystems кат номер 402837. Использование POP-4 или

DP-7 полимеров определяется пользователем.

JX Genetic Analyzer Buffer, Applied Biosystems кат номер 402824

i-Di™ Formamide, Applied Biosystems кат номер 4311320

YEnamic ET Terminator Matrix Standards, Amersham Biosciences кат номер US84001

GE-4 (10mM Tris, pH 8.3, 0.1mM EDTA), Teknova кат номер 0223

Absolute Ethanol, Sigma Aldrich кат номер 270741-1L

Molecular Biology grade Agarose, Invitrogen кат номер 75000500

Ethidium Bromide, Amresco кат номер X328-10mL

PCR Marker с шагом 300 – 1300 bp, Invitrogen кат номер

74601250 (рекомендован) or Clear Band Loading Buffer MTR Scientific кат номер CB5

Программное обеспечение Секвенатора:

При работе с ABI 3100

• ABI Prism® Data Collection Software v1.1 или выше (Win NT)

• Sequencing Analysis Software v3.7 или выше (Win NT)

HLA Sequencing Analysis Software

Invitrogen uTYPE® SBT software кат номер 539991

VI. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Смеси для амплификации:

Смесь для амплификации Amp Mix из наборов SeCore® Sequencing Kits не содержит FastStart™ Taq ДНК полимеразу. Для приготовления мастер-микса для амплификации геномной ДНК, смешайте локус-специфическую Amp Mix в чистой пробирке с FastStart™ Taq ДНК полимеразой.

Замечание: Рекомендуется, чтобы мастер-микс готовилась одновременно минимум для 5 образцов, это способствует точности дозирования малых объемов фермента. Объемов реагентов, поставляемых в наборе, хватает для 5 наборов таких реакций. Использование пластика других производителей требует предварительной проверки.

Подготовка Класс I реакций амплификации:

Для каждой реакции амплификации смешайте 19.8 мкл смеси для амплификации Amp Mix с 0.2 мкл FastStart™ Taq ДНК полимеразы. Перемешайте 2-3 раза. Для получения мастер-микса на несколько реакций используйте Таблицу ниже для расчёта объемов Amp Mix и FastStart™ Taq ДНК полимеразы. Приготовленной смеси мастер-микс должно хватить на 2 дополнительные реакции для расчёта объема потери при дозировании (пипеттировании) и на 1 реакцию с отрицательным контролем.

Класс I	n=Кол-во образцов			
	n=5	n=10	n=15	n=25
Смесь для амплификации Amp Mix (n+2 реакции)x 19.8	138.6 мкл	237.6 мкл	336.6 мкл	534.6 мкл
FastStart™ Taq ДНК полимеразы (n+2 реакции)x 0.2	1.4 мкл	2.4 мкл	3.4 мкл	5.4 мкл

Подготовка Класс II реакций амплификации:

Для каждой реакции амплификации смешайте 22.8 мкл смеси для амплификации Amp Mix с 0.2 мкл FastStart™ Taq ДНК полимеразы. Перемешайте 2-3 раза. Для получения мастер-микса на несколько реакций используйте Таблицу ниже. Приготовленной смеси мастер-микс должно хватить на 2 дополнительные реакции для того, чтобы учесть объем потери при дозировании (пипеттировании), и на 1 реакцию с отрицательным контролем.

Класс II	n=Кол-во образцов			
	n=5	n=10	n=15	n=25
Смесь для амплификации Amp Mix (n+2 реакции)x 22.8	159.6 мкл	273.6 мкл	387.6 мкл	615.6 мкл

Start™ Taq ДНК лигаза (реакции)х 0.2	1.4 мкл	2.4 мкл	3.4 мкл	5.4 мкл
--	---------	---------	---------	---------

Подготовка контролей

Положительный контроль ДНК включен в наборы локусов A, B, Cw, DQB1, DRB1 для контроля качества и разрешения проблемных ситуаций. Необходимо включать положительный контроль в каждое исследование. Используемый контроль ДНК это A*010101, 030101, B*0801, 520101, Cw*070101, 120202, DRB1*030101, 150201, DQB1*0201, 060101.

III. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

A. Неоткрытые флаконы

Все реагенты, за исключением смесей для амплификации, должны храниться при -20°C в холодильнике системы No-Frost. Смеси для амплификации должны храниться при температуре 4-8°C. Реагенты стабильны до истечения срока, указанного на коробке. Внимание: Реагенты светочувствительны, поэтому должны храниться в темноте.

B. Открытые флаконы

Рекомендации см ниже в разделе IX

VIII. СБОР ОБРАЗЦОВ, ПРИГОТОВЛЕНИЕ, ХРАНЕНИЕ И РАЗБАВЛЕНИЕ

A. Сбор образцов и приготовление

Для исследования подходит очищенная ДНК с показателем OD 260/280 от 1.7 до 1.9.

Условия взятия образца могут влиять на измеряемое значение в сыворотке и плазме, следовательно, необходимо строго соблюдать предосторожности при взятии материала, чтобы исключить контаминацию образца.

Собирать образцы необходимо в апиrogenные пробирки. Плазму можно собирать в стерильные пробирки с ЭДТА или гепарином (при 4°C) в качестве антикоагулянтов и быстро отделять от клеток центрифугированием.

B. Хранение

Образцы сыворотки/плазмы необходимо хранить при -20°C максимум 2 месяца и при -70°C в течение более долгого времени.

C. Разбавление образцов

Выделенная ДНК разводится до 15-30 нг/мкл при помощи TE-4. Разведение TE-4 рекомендуется, если предполагается хранение образца ДНК. ДНК можно разводить водой, если предполагается использовать для исследования немедленно. Сразу после использования остатки должны быть утилизированы.

IX. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Для получения достоверных результатов необходимо следовать рекомендациям настоящей инструкции.

A. Замечания по выполнению анализа

Наборы локусов A, B, Cw содержат 1 смесь для амплификации. Ставьте 1 реакцию для каждого образца плюс используйте 1 отрицательный контроль для группы образцов, подлежащих амплификации.

Набор B-Locus Group kit содержит 2 набора смесей для амплификации. Обе амплификации следует проводить для каждого образца. Используйте 1 отрицательный контроль для каждого набора смесей для амплификации Amp Mix.

Наборы локусов DQB1, DRB1 содержат 1 смесь для амплификации. Ставьте 1 реакцию для каждого образца плюс используйте 1 отрицательный контроль для группы образцов, подлежащих амплификации.

Набор DRB Group Kit (групп-специфический набор) содержит 11 комплектов смесей для амплификации. Этот набор разработан для амплификации основных 11 DRB1/3/4/5 групп для лучшего разрешения и облегчения последующего анализа. Все 11 реакций амплификации проводятся с образцами неизвестного генотипа. Используйте 1 отрицательный контроль для каждого комплекта смесей для амплификации.

Набор локуса DPB включает 4 набора смесей для амплификации. Все 4 реакции амплификации должны быть проведены с образцами неизвестного генотипа. Используется 1 отрицательный контроль для каждого комплекта смесей для амплификации.

Набор DQB1 Two Amp kit содержит 2 комплекта смесей для амплификации. Обе DQB1 реакции амплификации должны быть проведены для каждого образца. Ставятся 2 реакции для каждого образца. Используется 1 отрицательный контроль для каждого комплекта смесей для амплификации.

Замечание: Когда известны результаты низкоразрешающего HLA-типирования образца, пользователь может выбрать необходимые группы для амплификации и высокоразрешающего DPB1- или DRB1- секвенирования.

Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения

Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.

Используйте чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, стандарта, контроля или образца, чтобы исключить контаминацию.

B. Процедура анализа

Постановка амплификации

класса

Добавьте 5 мкл каждого образца ДНК (15-30 нг/мкл) в пробирку. Добавьте 5 мкл стерильной воды в реакцию с отрицательным контролем.

Добавьте 20 мкл мастер-микса в каждую пробирку и центрифугируйте.

Поместите пробирки в термоциклёр. Запустите ПЦР в соответствии с амплификационным профилем, охарактеризованным ниже.

класса

Добавьте 2 мкл каждого образца ДНК (15-30 нг/мкл) в пробирку или лунку. Добавьте 2 мкл стерильной воды в реакцию с отрицательным контролем.

Добавьте 23 мкл мастер-микса в каждую пробирку.

Откройте пробирки и центрифугируйте.

Поместите пробирки в термоциклёр. Запустите ПЦР в соответствии с амплификационным профилем, охарактеризованным ниже.

Амплификационный профиль геномной ДНК для Класса I & II.

Шаг	Кол-во циклов	Температура	Время
Удержание	1	95°C	4 мин
Цикл	35	95°C	20 сек
		63°C	20 сек
		72°C	40 сек
Расширение	1	72°C	5 мин.
Удержание	1	4°C	Неопр.

Итоговая продолжительность ПЦР ≈ 1.5 часа.

Замечание: Если шаги 5 и 6 не предполагается проводить сразу, ПЦР продукты можно хранить при 4°C. Однако очистка ПЦР ампликонов (ExoSAP-IT) должна быть проведена в течение 24 часов.

Электрофорез в агарозном геле

Проведите детекцию продуктов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле (1.5-2%). Перенесите в агарозный гель 5 мкл ПЦР продукта и проводите разгонку в соответствии с Вашим лабораторным протоколом. Проводите разгонку в течение достаточного времени, чтобы проявились полосы ПЦР продуктов. Ампликоны правильного размера должны быть больше 35 нг при загрузке 5 мкл продукта в лунку. При подкрашивании бромидом этидия (250 нг/ мл агарозы) и использовании УФ лампы рассматривают полосы ПЦР продуктов, они должны быть эквивалентны или более сильно проявлены по сравнению с любой полосой рекомендованного маркера за исключением наиболее интенсивной 500 п.н.

Ожидаемые продукты для каждой локус-специфической амплификации:

Набор	Размер полосы продукта (п.н.)	Размер полосы внутреннего контроля (п.н.)
A Locus	~ 1100 и ~ 990	нет
B Locus Single Amplification	~ 1400 и ~ 950	нет
B Locus Group	~ 1250 и ~ 720	нет*
C Locus	~ 1375	нет
DRB1 Locus	~ 300	нет
DRB Group	~ 300	~ 600
DQB1 Locus	~ 350 и ~ 375	нет
DQB1 2 Amp	~ 350 и ~ 375	нет
DPB1 Locus	~ 300	~ 600

Замечание: Слабо проявленная полоса размером более 300 п.н. может наблюдаться для некоторых продуктов амплификации в наборе локуса DRB1. Результат секвенирования не зависит от дублетных полос.

Для детекции амплификаций при работе с набором B Locus Group Kit все реакции должны быть проверены в агарозном геле. В зависимости от типа образца полоса продукта размером 1250 п.н. может присутствовать в 1-2 из двух амплификаций. Для экзона 2 и 3 реакции секвенирования должны быть поставлены для всех амплификаций с позитивными треками размером 1250 п.н. Экзон 4 продукт (720 п.н.) идентичен в смеси 1 и смеси 2. Только 1 из 2 амплификационных пробирок необходима для секвенирования экзона 4.

Замечание: Если трек продукта размером 1250 п.н. присутствует в обеих амплификациях, секвенирование экзона 4 не является обязательным. Положительный трек в 1250 п.н. в каждой пробирке из двух комплектов пробирок представляет экзон 2 и 3 ампликоны по каждому отдельному аллелю в гетерозиготном типировании. Экзон 4 ампликон одинаков для обоих аллелей. Если экзон 4 ампликон секвенирован, результат следует анализировать отдельно от результатов для экзона 2 и 3.

Для подтверждения успешных амплификаций для набора локуса DRB Group Kit все реакции необходимо проверять в агарозном геле. Реакции секвенирования необходимо ставить для всех позитивных реакций (300 п.н.)

Для подтверждения успешных амплификаций для набора локуса DPB1 несколько амплификаций все реакции необходимо проверять в агарозном геле. Реакции секвенирования необходимо ставить для всех позитивных реакций (300 п.н.)

Очистка ПЦР ампликонов (ExoSAP-IT)

Очистка ПЦР ампликонов при помощи ExoSAP-IT расщепляет праймеры и гидролизует dNTPs.

Добавьте 4 мкл ExoSAP-IT в амплификационные пробирки.

При работе с набором B Locus Group kit добавляйте ExoSAP-IT только в пробирки с позитивными треками (1250 п.н.)

При работе с набором DRB Group Kit, добавляйте ExoSAP-IT только в пробирки с позитивными треками (300 п.н.)

При работе с набором DPB1 локуса, добавляйте ExoSAP-IT только в пробирки с позитивными треками (300 п.н.)

Встряхните пробирки и центрифугируйте примерно 5 сек.

Тщательно перемешайте реакционные смеси (примерно 5 сек.)

Центрифугируйте содержимое пробирок.

Поместите пробирки или планшет в термоциклер и используйте следующий режим:

Шаг	Кол-во циклов	Температура	Время
1	1	37°C	20 мин.
		80°C	20 мин.
Выдержка	1	4°C	Неопр.

Замечание: Очищенные при помощи ExoSAP-IT ампликоны могут храниться до 1 недели при -20°C.

Реакция секвенирования

Локус A, B, C несколько амплификаций, C	Локус DRB1	Локус DRB несколько амплификаций	Локус DQB1 и DQB1 2 амплификации	Локус DPB1
Экзон 2 прямой Экзон 2 обратный Экзон 3 прямой Экзон 3 обратный Экзон 4 прямой Экзон 4 обратный	Экзон 2 обратный Экзон 2 Прямой Кодон 86 обратный	Экзон 2 прямой Экзон 2 обратный Кодон 86 обратный	Экзон 2 прямой Экзон 2 обратный Экзон 3 Прямой Экзон 3 обратный	Экзон 2 прямой Экзон 2 обратный

Кол-во B локус реакций секвенирования в наборе B Locus Group kit будет варьировать в зависимости от кол-ва позитивных реакций. Если обе амплификационные реакции (1250 п.н.) позитивны, ставьте прямую и обратную реакцию секвенирования для экзонов 2 и 3 в обеих позитивных реакциях. Экзон 4 может быть секвенирован на этом этапе или после получения результатов типирования экзонов 2 и 3, когда станет ясно, поможет ли экзон 4 в разрешении неоднозначностей. Только 1 из 2 экзон 4 продуктов (720 п.н.) необходимо секвенировать для любого образца.

Для каждой позитивной локус DRB группно-специфической реакции, ставьте 2 реакции секвенирования. Минимальное число реакций секвенирования 2, если образец имеет только одну позитивную амплификацию. Максимальное число реакций секвенирования 8, когда образец имеет 2 позитивных амплификации DRB1 локуса и 2 позитивных амплификации DRB3/4/5 локуса. Реакцию кодон 86 в этом случае можно поставить по желанию (см. раздел 12).

Для каждой позитивной DPB1 групповой реакции ставьте 2 реакции секвенирования для каждой позитивной реакции.

Для набора локуса DQB1 2 Amp ставьте прямую и обратную реакцию секвенирования для экзонов 2 и 3 в обеих позитивных амплификациях. Экзон 2 смесь для секвенирования используют с экзон 2 ампликоном, а экзон 3 смесь для секвенирования – с экзон 3 ампликоном, что сводится в итоге к 4 реакциям секвенирования на 1 образец.

Очень важно убедиться, что подходящая смесь для секвенирования и ампликон помещены в нужную пробирку (лунку).

Внешний вид образца зависит от применяемого оборудования, например, от числа капилляров. См инструкцию к программному обеспечению uType™ Sequencing Analysis.

При использовании ABI 3100 предполагается использование 96 луночного планшета следующего вида:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Полоса 1											
B	Полоса 2											
C		Конфигурация планшета для каждого набора указана в описании процедуры исследования										
D												
E												
F												
G												
H												

Подготовка реакций секвенирования:

Только для класса II реакций добавьте 40 мкл ультрачистой воды в очищенные при помощи ExoSAP-IT ампликоны и хорошо перемешайте.

Для класса I и класса II реакций добавьте 2 мкл очищенных при помощи ExoSAP-IT ампликонов (или разведенных класс II ампликонов в соответствующую пробирку или лунку).

Добавьте 8 мкл каждой локус-специфической смеси в соответствующую пробирку или лунку.

ите пробирки или планшет, и аккуратно центрифугируйте пробирки или планшет.
 естите пробирки или планшет в термоциклёр и выберите следующий режим секвенирования:

Шаг	Кол-во циклов	Температура	Время
	25	95°C	20 сек.
		50°C	15 сек.
		60°C	60 сек.
ержка	1	4°C	Неопр.

е время реакции ~ 1.5 часа

Осаждение продуктов секвенирования этанолом

После проведения секвенирования необходимо провести в течение 24 часов осаждение продуктов секвенирования добавлением этанола для удаления остатков оснований. Инструкции одинаковы для реакций секвенирования класса I и II.
 Добавьте 2 мкл PPT буфера для секвенирования в каждую секвенирующую реакционную смесь.

Центрифугируйте.

Добавьте 40 мкл 100% этанола в каждую смесь.

Закройте планшет и перемешивайте в течение минимум 60 секунд.

Замечание: Предварительно убедитесь, что содержимое всех пробирок или лунок хорошо перемешано.

Центрифугируйте планшет в течение 30 минут с ускорением не менее 2000 g.

Снимите крышку, прикройте фильтровальным полотенцем и переверните. Центрифугируйте с фильтровальным полотенцем аккуратно (менее минуты при ускорении 500g) в перевернутой позиции для полного удаления жидкости.

Добавьте 100 мкл 70% этанола к осадку ДНК. Не двигайте планшет.

Центрифугируйте планшет в течение минимум 5 минут при ускорении не менее 2000 g.

Удалите супернатант переворачиванием планшета.

Замечание: Если используются отдельные пробирки, центрифугируйте пробирки в течение минимум 15 минут для начального осаждения и 5 минут для отмывки при 12000rpm. Удалите супернатант быстрым переворотом пробирки или аспирацией.

Капиллярный электрофорез продуктов секвенирования

Добавьте 15 мкл Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, артикул 4311320) к каждому осадку ДНК.

Замечание: Если на этом шаге используются отдельные пробирки, перенесите образцы в 96-луночный планшет

Закройте планшет и аккуратно центрифугируйте.

Денатурируйте образцы при 95 °C в течение 2 минут в термоциклёре.

Центрифугируйте аккуратно для удаления возможных пузырей воздуха в образцах.

Замечание: Если пузырьки воздуха проникнут в капилляры, это приведет к их разрушению.

Поместите планшет в секвенатор.

Режим электрофореза в случае использования капиллярного секвенатора ABI Prism 3100:

Параметры		Установки
Dye Set		F
Mobility File		DT3100POP6{ET}36CM.MOB
Run Module	Класс I	RapidSeq36_POP6 (переименуйте новый модуль например RapidSeq36_Class I и сохраните) Измените время перенесения образцов на 14 сек., время ошибки запуска 2400 сек.
	Класс II	RapidSeq36_POP6 (переименуйте новый модуль например RapidSeq36_Class II и сохраните) Измените время перенесения образцов на 10 сек., время ошибки запуска 1600 сек.
Analysis Module		BC-3100POP6RR-SeqOffFtOff.saz

При первом запуске Dyenamic ET Terminator, необходимо поставить матричные стандарты. Следуйте инструкции к Dyenamic ET Terminator (Amersham)

X. РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

A. Расчёт результатов

Рассчитайте результаты согласно инструкции к прибору и программному обеспечению.

Используйте программное обеспечение для секвенирования для сбора первичных данных и создания файлов по секвенированию.

Используйте программное обеспечение для анализа секвенирования uTYPE SBT HLA для работы с данными файлов по секвенированию и создания отчёта по HLA-типированию.

Замечание: Рекомендуются устанавливать самую последнюю версию базы данных по специфичностям.

DR Codon 86 секвенирование

в полученных результатах DRB1-типирования много неоднозначностей, необходимо проверить нуклеотиды секвенированные с кодон 86. 2 последовательные позиции с КК последовательностью (K=G/T) показывают связанную с кодом 86 неоднозначность. Это может наблюдаться при работе с локус DRB1 набором для секвенирования или со следующими группо-специфическими ампликонами: DRB1*03/11/13/14, DRB1*04, DRB1*08/12, DRB1*15/16, DRB3, DRB5 с **DRB Group** набором для секвенирования. Гены DRB1 могут быть разделены на 2 группы, основываясь на последовательности кодона 86: 1 группа с последовательностью GTG и 2 группа с последовательностью GGT в этой позиции. Использование GTG специфической смеси праймеров (TG Codon 86 Rev Seq Mix) позволяет выделить одну из двух цепей образца, для разрешения Codon 86 ассоциированной неоднозначности. Результатом будет служить выявление одного члена из пары в образце. DR Codon 86 секвенирование проводится одновременно или после DR секвенирования.

Использованные при помощи ExoSAP-IT ампликоны из наборов для секвенирования локус DRB1 и локус DRB3, 4&5 используются для реакции секвенирования.

Следуйте инструкциям раздела 7.2. для постановки реакции секвенирования.

Следуйте инструкциям разделов 8-10 для завершения реакций секвенирования.

Данные следует анализировать совместно с данными, полученными при работе с наборами SeCore DRB1 Locus Sequencing Kit или DRB Sequencing Kit, несколько амплификаций.

SeCore DPB1 Codon 8 и 85 секвенирование

Группо-специфические праймеры для секвенирования (GSSPs) совместно с набором SeCore DPB1 Kit (codon 8 + 85) позволяют разрешить примерно 68.5% неоднозначностей при работе с реагентами **DPB1 Locus** (статистические данные).

Широкий спектр предлагаемых смесей группо-специфических праймеров для секвенирования (GSSP) служит ключом к разрешению неоднозначностей в HLA-типировании. При помощи разработанного программного обеспечения uTYPE v 4.0 для анализа нужную смесь праймеров GSSP можно подобрать автоматически, исключая тем самым ручной подбор.

XI. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

До начала работы с наборами SeCore HLA Sequencing Kit в Вашей лаборатории выполните контроль качества для методов, основанных на секвенировании, на образцах, прошедших молекулярное типирование.

В целях проверки всех смесей праймеров на молекулярно-типированных образцах ДНК. В силу труднодоступности молекулярно-типированного референтного материала некоторые лунки не проверялись позитивным контролем ДНК.

Рекомендуется, чтобы все гомозиготные результаты типирований проверялись в дальнейшем другими методами.

Пулы сыворотки или гепаринизированной плазмы, а также супернатанты стимулированных клеточных культур, немедленно собранные в аликвоты и замороженные, могут использоваться в качестве контролей. Повторное замораживание-размораживание не допускаются.

Ведение записей: хорошим лабораторным правилом считается запись серии набора и дату растворения (разбавления) используемых реагентов.

Контроли: рекомендуется использовать контроли рутинно при каждой постановке для оценки вариабельности анализа.

Рекомендуется вести контрольные карты качества для отслеживания характеристик наборов. Контрольные диапазоны

указаны на этикетках флаконов. Результаты вне контрольного диапазона означают, что анализ необходимо повторить.

Повторное измерение образцов также может быть использовано для оценки межсерийной воспроизводимости.

Образцы: строго следуйте инструкции пользователя при сборе и хранении образцов. Всегда используйте одноразовые наконечники для исключения контаминации остатками реагентов.

XII. ДИАПАЗОН ОЖИДАЕМЫХ ЗНАЧЕНИЙ

Некоторые DR аллели амплифицируются при помощи других наборов для секвенирования для DRB1, DRB3, 4&5. Таблица внизу может быть неполной.

Аллели	Амплифицированные при помощи Amp Mix
DRB1*0820	DRB1*03/11/13/14
DRB1*1122 DRB1*1410	DRB1*04
DRB1*1105 DRB1*1317 DRB1*1404 DRB1*1411 DRB1*1415 DRB1*1428 DRB1*1431	DRB1*08/12
DRB1*1130 DRB1*1446	DRB3

Амплификационная смесь Amp Mix в наборе для секвенирования локуса DRB1 не амплифицирует аллели DRB1*1130, DRB1*1446. Однако эти аллели могут быть амплифицированы при помощи смеси для амплификации Amp Mix из набора для секвенирования DRB1, DRB3, 4&5 Sequencing Kit.

Бледная полоса неправильного размера > 300 нуклеотидных пар может наблюдаться для некоторых продуктов амплификации при работе с наборами локусов DRB1, DQB1. На результаты секвенирования не влияет наличие дублетных полос.

улучшения качества работы наборов и реагентов для секвенирования следует придерживаться указанных выше рекомендаций по материалам, реагентам и оборудованию.

Возможные неоднозначности всех локусов можно найти на ресурсе www.ebi.ac.uk/imgt/hla/ambig/html. Перечень неоднозначностей помещен также на сайте компании <http://www.invitrogen.com>.

Решение проблемных ситуаций

Проблемы	Возможные причины	Решения
Слабая или отсутствующая амплификация по всему планшету	FastStart™ Taq полимераза не была добавлена в смесь для амплификации, либо смесь не была хорошо перемешана после её добавления	Проведите повторную амплификацию, проконтролируйте при этом добавление полимеразы и последующее размешивание смеси для амплификации
	Неполадки в работе термоциклера	Проверьте протокол запуска термоциклера. Обратитесь в службу технической поддержки или проведите перепрограммирование прибора.
	Концентрация ДНК не оптимальна	Используйте ДНК, разведенную до концентрации 15-25 нг/мкл. Замечание: В случае, если концентрация ДНК низкая, а амплификация слабая, секвенируйте образец. Результаты секвенирования и типирования могут получиться хорошими.
	ДНК низкого качества или разложившаяся ДНК	Проводите электрофоретическое разделение ДНК в 1% агарозном геле для оценки качества ДНК. Цельная геномная ДНК должна иметь ~ 3000 п.н.
	Гелевая картинка очень яркая	Повторите электрофорез в агарозном геле, используя другой буфер. Например, можно рекомендовать ClearBand Sample Loading Buffer, MTRScientific артикул CB5
Избыток продуктов амплификации (за исключением DRB1 продукта амплификации)	Была использована неверная программа работы термоциклера	Повторите амплификацию с правильной программой
	Контаминация смеси для амплификации, образца ДНК или рабочей области в лаборатории	Выделите ДНК из свежего образца. Повторите амплификацию.
Флуктуационный шум	ExoSap-IT не добавлена для очистки ампликонов перед секвенированием	Добавьте смесь ExoSap-IT в ПЦР продукт
	ExoSap-IT не перемешана с ПЦР продуктом	Аккуратно перемешайте после добавления к ампликонам ExoSap-IT
	Сигнал очень сильный	См раздел ниже "Очень сильный сигнал"
	Слабая или неправильная матрица	ABI 3100: Проведите спектральную перекалибровку прибора или попробуйте внести образцы заново
	Неправильное перенесение образцов из планшета на гелевые треки (ABI 3100)	Загрузите образцы заново

	ABI 3100: Время для загрузки образцов установлено слишком продолжительное	ABI 3100: Снизьте этот показатель и попробуйте загрузить образцы заново. Сила сигнала в 100-1500 оптимальна. (Образцы низкого качества могут иметь более низкую силу сигнала, но их также можно анализировать и типировать. Некоторые образцы могут иметь силу сигнала выше 1500 и при этом не будет наблюдаться флуктуационного шума.)
	Слабая реакция секвенирования из-за ошибки пипеттирования	Убедитесь, что для секвенирования были смешаны очищенные при помощи ExoSap-IT ампликоны и нужная смесь для секвенирования
	Чрезмерное добавление этанола	Повторное секвенирование и увеличение времени внесения образцов
Слабый сигнал	Смеси, подготовленные для секвенирования, не были хорошо перемешаны после добавления PPT буфера для секвенирования и этанола.	Повторите реакции секвенирования. Аккуратно перемешивайте компоненты (50-60 сек) после добавления этанола. Убедитесь, что все компоненты хорошо перемешаны.
	Время для внесения образцов должно быть увеличено	Повторите реакции секвенирования и увеличьте время для внесения образцов.
Пятна на гелевых треках	PPT буфер не добавлен в реакции секвенирования перед добавлением 70% этанола	Повторите реакцию секвенирования. Добавьте PPT буфер перед внесением этанола.
	Неудачная попытка осаждения продуктов секвенирования 70% этанолом	Повторите реакции секвенирования, не пропустите этот этап (добавление этанола)
	Слабая реакция секвенирования из-за ошибки пипеттирования или слабой амплификации	Убедитесь, что добавлены очищенные ExoSap-IT ПЦР продукты и подходящая смесь для секвенирования и всё тщательно перемешано. В случае слабой амплификации подтвердите интенсивность продукта амплификации разгонкой в агарозном геле.
	Неудачная попытка удаления остатков этанола в процессе осаждения	Повторите реакции секвенирования. Этап центрифугирования 500 x g очень важен для удаления остатков этанола в реакционных пробирках
	Этанол, используемый на стадии очистки оказался слишком разбавленным	Повторите реакции секвенирования, убедившись в правильной концентрации этанола (70%)
Слишком сильный сигнал	ABI 3100: установленное время для внесения образцов слишком продолжительное	ABI 3100: Сократите время для внесения образцов, внесите их заново. Сила сигнала в 100-1500 оптимальна. (Образцы низкого качества могут иметь более низкую силу сигнала, но их также можно анализировать и типировать. Некоторые образцы могут иметь силу сигнала выше 1500 и при этом не будет наблюдаться флуктуационного шума.)

чайные неполадки в енировании	Слабая реакция секвенирования по причине ошибки в пипеттировании	Убедитесь, что добавлены очищенные EhoSap-IT ПЦР продукты и подходящая смесь для секвенирования и всё тщательно перемешано.
----------------------------------	--	---

III. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

ВНИМАНИЕ: ПОТЕНЦИАЛЬНО БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫЙ МАТЕРИАЛ!

Все компоненты крови и биологические материалы могут быть потенциально опасны. Так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия каких-либо инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом.

Нельзя есть, пить, курить или пользоваться косметикой в месте, где используется набор.

Нельзя пипетировать ртом.

Информация для заказа

119899, Москва, Ленинские горы,

ЗАО "БиоХимМак"

тел. (095) 939-24-21, факс (095) 939-09-97

info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики

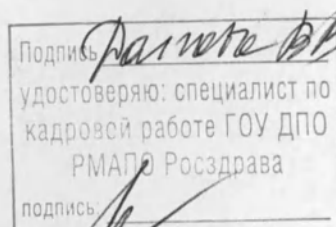
«РМАПО Росздрава»



[Handwritten signature]

д.м.н., профессор Долгов В.В.

« ____ » ____ 2011г.



Всего прошито

и пронумеровано

11 листов

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.

